

Субпопуляции Т- и В- лимфоцитов на ранней и развернутой стадиях ревматоидного артрита

Мартынова А.В.¹, Попкова Т.В.¹, Алексанкин А.П.², Гриднева Г.И.¹,
Герасимова Е.В.¹, Горбунова Ю.Н.¹, Семашко А.С.¹, Лиля А.М.^{1,3}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва; ³кафедра ревматологии
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»

Минздрава России, Москва

¹Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; ²Россия, 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3;

³Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Цель исследования — оценить изменения субпопуляций Т- и В-лимфоцитов на разных стадиях ревматоидного артрита (РА).

Пациенты и методы. В исследование включено 53 пациента с достоверным диагнозом РА по критериям ACR/EULAR 2010 г. (средний возраст 54,2 [47; 62] года). В 1-ю группу вошли 27 больных (25 женщин и 2 мужчины), ранее не принимавших синтетические базисные противовоспалительные препараты (сБПВП), во 2-ю группу — 26 пациентов (22 женщины и 4 мужчины), получающие сБПВП (метотрексат либо лефлуномид). Контрольную группу составили 29 здоровых добровольцев (23 женщины и 6 мужчин), медиана возраста — 58,5 [53; 62] года. Всем участникам исследования проведена проточная цитофлюорометрия по стандартной методике с иммунофенотипированием Т- и В-лимфоцитов.

Результаты и обсуждение. По сравнению с контролем у пациентов 1-й группы, не получавших ранее сБПВП, выявлено транзиторное повышение «переключенных» В-клеток памяти, транзиторных В-клеток и плазмобластов, не отмеченное у пациентов 2-й группы (терапия сБПВП). У пациентов с развернутым РА обнаружено статистически значимое снижение абсолютного и относительного числа В-клеток памяти, абсолютного и относительного числа «переключенных» В-лимфоцитов, а также числа плазмобластов и транзиторных клеток. У больных РА установлена статистически значимая связь между числом припухших суставов и уровнем плазмобластов ($r=0,51$), клеток памяти ($r=0,54$) и «переключенных» В-клеток ($r=0,41$), $p<0,05$ во всех случаях. Статистически значимых изменений иных субпопуляций В-лимфоцитов и профиля Т-лимфоцитов не отмечено.

Заключение. Изменение профиля В-лимфоцитов характерно для разных стадий РА. На ранней стадии отмечается увеличение числа транзиторных В-лимфоцитов, плазмобластов и плазмоцитов, а в развернутой стадии — снижение уровня отдельных популяций В-лимфоцитов, таких как В-клетки памяти и «переключенные» В-лимфоциты. Можно предположить, что неэффективность сБПВП связана с изменением популяционного состава В-лимфоцитов, что требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; иммунограмма; метотрексат; CD19+ В-клетки; В-клетки памяти; наивные В-клетки; двойные негативные В-клетки; проточная цитофлюорометрия.

Контакты: Татьяна Валентиновна Попкова; popkovatv@mail.ru

Для ссылки: Мартынова АВ, Попкова ТВ, Алексанкин АП и др. Субпопуляции Т- и В- лимфоцитов на ранней и развернутой стадиях ревматоидного артрита. Современная ревматология. 2021;15(2):17–22. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-2-17-22

T- and B-lymphocytes subpopulations in the early and advanced rheumatoid arthritis

Martynova A.V.¹, Popkova T.V.¹, Aleksankin A.P.², Gridneva G.I.¹, Gerasimova E.V.¹,
Gorbunova Yu.N.¹, Semashko A.S.¹, Lila A.M.^{1,3}

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow;

²Research Institute of Human Morphology, Moscow;

³Department of rheumatology Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow

¹34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia; ²3, Tsyurupy, Moscow 117418, Russia;

³2/1, Barrikadnaya St., Build. 1, Moscow 125993, Russia

Objective: to evaluate changes in T- and B-lymphocyte subpopulations at different stages of rheumatoid arthritis (RA).

Patients and methods. The study included 53 patients with a definite RA diagnosis according to the 2010 ACR/EULAR criteria (mean age 54.2 [47; 62] years). Group 1 included 27 patients (25 women and 2 men) without history of synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs (sDMARDs) intake, group 2 included 26 patients (22 women and 4 men) receiving sDMARDs (methotrexate or leflunomide). The control group consisted of 29 healthy volunteers (23 women and 6 men), the median age was 58.5 [53; 62] years. In all participants flow cytometry according to the standard technique with immunophenotyping of T- and B-lymphocytes was performed.

Results and discussion. Compared to controls, patients in group 1 who had not previously received sDMARDs showed a transient increase in "switched" memory B-cells, transient B-cells, and plasmablasts, which was not observed in patients of group 2 (on sDMARDs therapy). Patients with advanced RA showed a statistically significant decrease in the absolute and relative number of memory B-cells, the absolute and relative number of "switched" B-lymphocytes, as well as the number of plasmablasts and transient cells. In RA patients, a statistically significant rela-

tionship was established between the number of swollen joints and the level of plasmablasts ($r=0.51$), memory cells ($r=0.54$), and "switched" B-cells ($r=0.41$), $p<0,05$ in all cases. There were no statistically significant changes in other subpopulations of B-lymphocytes and the profile of T-lymphocytes.

Conclusion. Changes in the B-lymphocyte profile are characteristic of different stages of RA. At an early stage, there is an increase in the number of transient B-lymphocytes, plasmablasts and plasmocytes, and in the advanced stage, a decrease in the level of certain populations of B-lymphocytes, such as memory B-cells and "switched" B-lymphocytes. It can be assumed that the ineffectiveness of sDMARDs is associated with a change in the population composition of B-lymphocytes, which requires further study.

Key words: rheumatoid arthritis; immunogram; methotrexate; CD19+ B-cells; Memory B-cells; naive B-cells; double negative B-cells; flow cytometry.

Contact: Tatyana Valentinovna Popkova; popkovatv@mail.ru

For reference: Martynova AV, Popkova TV, Aleksankin AP, et al. T- and B-lymphocytes subpopulations in the early and advanced rheumatoid arthritis. *Sovremennaya Revmatologiya*=*Modern Rheumatology Journal*. 2021;15(2):17–22. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-2-17-22

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное ревматическое заболевание, характеризующееся тяжелым прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, связанным с глобальными нарушениями в системе гуморального и клеточного иммунитета [1]. Важное влияние на развитие РА оказывают не только провоспалительные цитокины, продуцируемые фибробластами, макрофагами, дендритными клетками, Т-лимфоцитами и др., но и продукция антител В-лимфоцитами. Мощным патологическим сигналом аутоиммунного воспаления являются IgG, IgA и образованные ими иммунные комплексы. Известно о прямом повреждающем действии антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и антител к модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ), которые появляются у пациентов с серопозитивным РА в раннем периоде болезни [2, 3]. Продукция антител к цитруллинированному белкам (АЦБ) связана с патологической активацией В-лимфоцитов. Образование большого числа ревматоидных факторов (РФ), встречающихся у 80% больных РА, приводит к активации системы комплемента и напрямую коррелирует с активностью заболевания [4], принимает участие в патогенезе РА и оказывает непосредственное повреждающее действие. Формирование эктопических герминативных центров в области пораженных суставов стимулирует дифференцировку В-лимфоцитов и последующее нарастание активности РА [5, 6]. Одновременно В-лимфоциты выполняют антигенпрезентующую функцию, что приводит к нарушению саморегуляции и активации Т-лимфоцитов, вызывающих цитокиновый каскад [7].

«Золотым стандартом» терапии РА является метотрексат (МТ), применение которого позволяет снизить клинико-лабораторную активность заболевания. Ранее было описано снижение числа В-лимфоцитов при эффективном применении МТ у больных РА, однако изменения Т- и В-лимфоцитов при разной продолжительности РА и неэффективности терапии МТ не изучены.

Цель исследования — оценить изменения субпопуляций Т- и В-лимфоцитов на разных стадиях РА

Пациенты и методы. В исследование включено 53 пациента с достоверным диагнозом РА, установленным по критериям Американской коллегии ревматологов / Европейской антиревматической лиги (American College of Rheumatology, ACR / European League Against Rheumatism, EULAR) 2010 г. Средний возраст больных составил 54,2 [47; 62] года. В 1-ю группу вошли 27 больных (25 женщин и 2 мужчины), ранее не принимавших синтетические базисные противовоспалительные препараты (сБПВП), во 2-ю группу — 26 пациентов (22 женщины и 4 мужчины), получающие сБПВП (МТ либо

лефлуномид). Общая характеристика больных РА представлена в табл. 1. Во 2-й группе 23 (88,5%) пациента использовали МТ в дозе 20 [15; 20] мг/нед в среднем в течение 24 [6; 50] мес, остальные — лефлуномид по 20 мг/сут на протяжении такого же времени. Исходно внесуставные проявления РА в обеих группах не выявлялись. Контрольную группу составили 29 здоровых добровольцев (23 женщины и 6 мужчин), медиана возраста — 58,5 [53; 62] года. Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

Для исследования В- и Т-лимфоцитов использовали цельную кровь из локтевой вены (2,7 мл), которую собирали в вакуумную пробирку с добавлением солей этилендиаминтетраацетата в концентрации 1,6 мг/мл (S-monovette, 2,7 ml K3E; Sarstedt, Германия). Иммунофенотипирование В-лимфоцитов периферической крови, включавшее определение В-лимфоцитов (CD19+), общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+), «переключенных» (CD19+IgD-CD27+) и «непереключенных» (CD19+IgD+CD27+) В-клеток памяти, наивных (CD19+IgD+CD27-), дубль-негативных клеток (CD19+IgD-CD27-) и транзиторных (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-) В-лимфоцитов, плазмочитов (CD19+CD38+) и плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-), проводилось методом многоцветной проточной цитофлюорометрии. Этим же методом осуществлялось иммунофенотипирование субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3+), в частности Т-хелперов (Тх, CD3+CD4+), Т-цитотоксических клеток (Тц, CD3+CD8+), индекса отношения Т-хелперов к Т-цитотоксическим лимфоцитам (Тх/Тц) и натуральных киллеров (НК, CD3-CD56+). Использовались конъюгированные мышиные моноклональные антитела (мАТ): CD19-ECD (R-Phycoerythrin-TexasRed®-X, IgG1, фикоэритрин тексасский красный); CD45-PC7 (R-Phycoerythrin Cyanin 7, IgG1, фикоэритрин цианин 7), CD38-PC5 (R-Phycoerythrin Cyanin 5.1, IgG1, фикоэритрин цианин 5.1); CD20-PC5 (Beckman Coulter, США); CD10-PE (IgG1, H110a), CD27-PE (IgG1, MT271, Becton Dickinson, США), а также человеческие мАТ: IgD-FITC (Fluorescein Isothiocyanate, IA62, флюоресцеин изотиоцианат, Becton Dickinson, США). Изотипический (негативный) контроль проводился для определения границ неспецифического связывания рецепторов В-лимфоцитов с мАТ с помощью набора реагентов Simultest IMK Plus Kit (CD45-FITC, CD14-PE, CD3-FITC, CD19-PE, CD4-FITC, CD8-PE) и IgG1-FITC, IGG2a-PE (Becton Dickinson, США). Для каждого пациента использовались две полипропиленовые пробирки Coulter (12×75 мм, Beckman Coulter, США). К 50 мкл (1×10^6 клеток) образцов крови

Таблица 1. Общая характеристика пациентов с РА
Table 1. General characteristics of patients with RA

Показатель	1-я группа (n=27)	2-я группа (n=26)
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	57,5 [49; 63]	53 [46; 65]
Длительность заболевания, мес, Ме [25-й; 75-й перцентили]	6 [5; 12]	84 [24; 121]*
DAS28, Ме [25-й; 75-й перцентили]	5,8 [5,2; 6,2]	6,4 [5,8; 6,9]*
Серопозитивность по РФ, n (%)	20 (74)	23 (88,5)
Серопозитивность по АЦЦП, n (%)	11 (41)	23 (88,5)*
Прием ГК, n (%)	—	18 (69)
Прием НПВП, n (%)	24 (89)	17 (65)
Продолжительность терапии МТ, мес, Ме [25-й; 75-й перцентили]	—	24 [7; 50]
Средняя доза МТ, мг/нед, Ме [25-й; 75-й перцентили]	—	20 [15; 20]
ЧБС, Ме [25-й; 75-й перцентили]	8 [5; 8]	11 [8; 18]*
ЧПС, Ме [25-й; 75-й перцентили]	4 [3; 6]	12 [6; 16]*

Примечание. ЧБС — число болезненных суставов; ЧПС — число припухших суставов; ГК — глюкокортикоиды; НПВП — нестероидные противовоспалительные препараты; * — значимые различия между группами ($p < 0,05$).

добавляли 5 мкл меченых МАТ и помещали в темное место при комнатной температуре. После 15-минутной инкубации эритроциты лизировали с помощью коммерческого набора IOTest 3 Lysing Solution (Beckman Coulter, США). В полученную суспензию лимфоцитов вносили 50 мкл Flow-Count™ Fluorospheres и проводили оценку результатов пятицветного окрашивания лимфоцитов на анализаторе Navios. Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий. Клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения CXR (Beckman Coulter, США).

Уровень СРБ и IgM РФ в сыворотке крови измеряли иммунонефелометрическим методом на анализаторе BN Pro Spec (Siemens, Германия), с использованием коммерческого набора фирмы Axis-Shield (Великобритания), АЦЦП определялся методом иммуноферментного анализа. Границей нормы для СРБ считался уровень < 5 мг/л, для РФ — < 15 МЕ/мл, для АЦЦП — < 20 Ед/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Результаты пред-

ставлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме [25-й; 75-й перцентили]). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

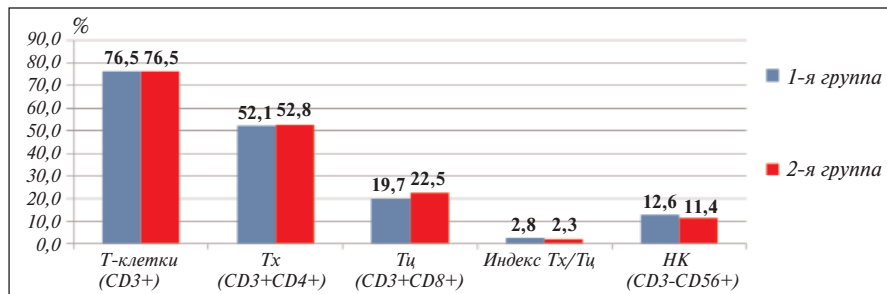
Результаты. В обеих группах выявлялась высокая активность РА. В 1-й группе уровень СРБ составил 24 [8,6; 77] мг/л, DAS28 — 5,8 [5,15; 6,2], во 2-й группе — 40 [15,5; 72,9] мг/л и 6,31 [5,64; 6,88] соответственно.

У больных РА обеих групп выявлены различия в субпопуляциях В-лимфоцитов и общем снижении абсолютного числа В-лимфоцитов по сравнению с контролем, при этом общее число лейкоцитов оставалось в пределах нормы: в 1-й группе — $6,3 \times 10^9$ /л [5,9; 8,0], во 2-й группе — $7,6 \times 10^9$ /л [6,2; 9,3]. Распределение субпопуляций В-лимфоцитов представлено в табл. 2.

В обеих группах пациентов с РА выявлена статистически значимая связь между ЧПС и числом плазмобластов ($r=0,51$), клеток памяти ($r=0,53$) и «переключенных» В-клеток ($r=0,41$), $p < 0,05$ во всех случаях.

В 1-й группе по сравнению с контролем отмечено повышение уровня «переключенных» В-клеток памяти (CD19+ IgD-CD27+), транзиторных В-клеток (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-), плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-) и снижение абсолютного числа В-лимфоцитов ($p < 0,05$). Выявлено статистически значимое повышение концентрации плазмобластов (CD19+CD38++) в крови у больных, не получавших ранее БПВП (1-я группа).

В группе пациентов с развернутым РА отмечалось статистически значимое снижение абсолютного и относительного числа В-клеток памяти, абсолютного и относительного числа «переключенных» В-лимфоцитов (CD19+IgD-CD27+). Снижение числа плазмобластов (CD19+CD38+++)



Распределение Т-лимфоцитов и НК-клеток, %
Distribution of T-lymphocytes and NK-cells, %

IgD-CD27+CD20-) и транзиторных клеток (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27) значительно чаще встречалось при большой длительности РА.

Не отмечено статистически значимых изменений иных субпопуляций В-лимфоцитов: дубль-негативных В-клеток (CD19+IgD-CD27-), наивных В-клеток (CD19+IgD+CD27-), «непереключенных» В-лимфоцитов (CD19+IgD+CD27+).

При сравнении пациентов двух групп более низкие относительные значения всех субпопуляций В-лимфоцитов выявлены при развернутом РА, кроме «непереключенных» В-клеток памяти (CD19+IgD+CD27+) и наивных В-клеток (CD19+IgD+CD27-).

У серопозитивных по АЦЦП пациентов с ранним РА по сравнению с серонегативными пациентами обнаруживались статистически значимо большее абсолютное число «непереключенных» В-лимфоцитов (CD19+IgD+CD27+) и абсолютное число транзиторных В-клеток (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-): 0,0237 и 0,007 ($p < 0,05$) и 0,00079 и 0,00027 ($p < 0,02$) соответственно. Взаимосвязи с иными показателями иммунограммы и уровнем РФ не выявлено.

При рассмотрении профиля Т-лимфоцитов статистически значимых изменений не отмечено (см. рисунок).

Обсуждение. Известно, что в патогенезе РА участвуют антителозависимые (продукция АЦБ, IgG и IgA) и антителонезависимые (продукция провоспалительных цитокинов, стимуляция Т-клеточного воспаления) реакции [7, 8]. Активация связанных генов и продукция интерлейкина (ИЛ) 2 приводят к пролиферации Т-лимфоцитов, что вызывает появление антигенспецифических Т-клеток, в частности CD8+ лимфоцитов. Это обуславливает элиминацию антигеннесущих таргетных клеток и выработку CD4+ Т-лимфоцитами провоспалительных цитокинов, индуцирующих активацию местных фагоцитов и лимфоцитов [9]. Происходит опосредованная миграция Т-лимфоцитов в область воспаленного сустава. Отсутствие увеличения числа Т-лимфоцитов и их популяций в нашем исследовании может свидетельствовать об ограниченном участии цитотоксического ответа у пациентов с высокой активностью РА и превалировании у них гуморального компонента воспаления. В то же время отмеченная тенденция к повышению количества цитотоксических Т-лимфоцитов указывает на гиперпродукцию фактора некроза опухоли α (ФНО α) и интерферона γ (ИФН γ). Так, многочисленные данные свидетельствуют о локальной,

Таблица 2. Распределение субпопуляций В-лимфоцитов
Table 2. Distribution of B-lymphocyte subpopulations

Субпопуляция В-лимфоцитов	1-я группа (n=27) абс., 10 ⁹ /л	%	2-я группа (n=26) абс., 10 ⁹ /л	%	Контрольная группа (n=29) абс., 10 ⁹ /л	%
В-лимфоциты (CD19+)	0,144 [0,1; 0,21]	9,1 [7,5; 10,9]	0,105 [0,1; 0,2]**	8,35 [6; 10,2]	0,2 [0,1; 0,2]	8,5 [7,2; 11,0]
В-клетки памяти (CD19+CD27+)	0,003 [0,00166; 0,0044]	2,1 [1,6; 3,1]	0,0015 [0,001; 0,003]*	1,25 [0,9; 1,7]**	0,003 [0,001; 0,007]	2,2 [1,1; 3,0]
«Переключенные» В-клетки памяти (CD19+IgD-CD27+)	0,0187 [0,0133; 0,0289]	16 [9,3; 18,4]	0,01 [0,005; 0,02]	6,8 [3,6; 11,6]**	0,02 [0,0; 0,04]	12,8 [9,3; 17,0]
«Непереключенные» В-клетки памяти (CD19+IgD+CD27+)	0,0073 [0,00619; 0,0122]	5,9 [3,6; 9,7]	0,009 [0,006; 0,01]	7,45 [5,1; 11,4]**	0,01 [0,005; 0,02]	7,4 [3,7; 11,1]
Дубль-негативные В-клетки (CD19+IgD-CD27-)	0,021 [0,011; 0,028]	14 [9,6; 19,5]	0,02 [0,01; 0,03]	15,05 [11,9; 18,1]	0,02 [0,01; 0,02]	13,3 [7,1; 19,3]
Наивные В-клетки (CD19+IgD+CD27-)	0,076 [0,063; 0,13]	61,6 [52,9; 68,8]	0,095 [0,07; 0,1]	70,85 [62,5; 75,6]**	0,1 [0,06; 0,1]	64,7 [57,6; 72,4]
Транзиторные В-клетки (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-)	0,000424 [0,000162; 0,000624]**	0,2 [0,1; 0,4]	0 [0; 0,0001]	0 [0; 0,1]	0,0001 [0; 0,0003]	0,1 [0; 0,1]
Плазмобласты (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-)	0,00071 [0,00023; 0,00129]**	0,4 [0,3; 0,8]**	0,0003 [0,00007; 0,0004]	0,15 [0,1; 0,3]	0,0002 [0,0001; 0,0004]	0,1 [0,1; 0,2]
Плазмоциты (CD19+CD38+)	0,000262 [0,000106; 0,000414]**	0,1 [0,1; 0,3]	0,0001 [0; 0,0002]	0,1 [0; 0,1]	0,0001 [0,00; 0,0002]	0,1 [0,05; 0,1]

Примечание. * – значимые различия между группами пациентов и контрольной группой ($p < 0,05$); ** – значимые различия между группами пациентов

интраартикулярной активации регуляторных Т-лимфоцитов и последующем увеличении уровней ИФН γ , ФНО α , ИЛ9, ИЛ10 и др. [10–14]. В работе не исследовались субпопуляции Т-хелперов, но их дифференцировка и активация различных субтипов может быть основой цитокиновой реакции. Кроме того, не исключено интраартикулярное увеличение числа некоторых субтипов Т-лимфоцитов в рамках эктопических герминативных центров [5, 6], что с большой долей вероятности может объяснять отсутствие у исследуемых пациентов внесуставных проявлений РА.

Активация гуморального компонента аутоиммунитета у пациентов с РА наблюдается еще до его манифестации или на ранней стадии заболевания. Описано появление нарастающих титров АЦЦП и РФ у лиц с высоким риском развития РА [2, 3]. Основой воспаления является патологическая активация В-клеток памяти в ответ на присутствие Т-лимфоцитов и факторов воспаления, которая приводит к массивной продукции иммуноглобулинов и аутоактивации иных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов. В обзоре S. Bugatti и соавт. [15] указывается на нарушение функционирования Т-регуляторных лимфоцитов и последующую дисрегуляцию продукции и апоптоза В-лимфоцитов. Выработка такими В-клетками сывороточного фактора активации В-лимфоцитов приводит к накоплению их числа и неконтролируемому взролению клеток. В настоящем исследовании изменения общего количества В-лимфоцитов по сравнению с таковым у здоровых лиц (контроль) не получено, в то время как нарушение субпопуляционного отношения со значимым уменьшением уровня В-клеток памяти, транзиторных и переключенных В-лимфоцитов, а также плазмобластов отмечалось не только у пациентов 1-й группы, но и у пациентов 2-й группы с развернутым РА и неэффективностью СБПВП.

В связи с нарушением созревания и апоптозом В-лимфоцитов, а также их миграции в полость сустава, было ожидаемо снижение абсолютного и относительного числа «переключенных» В-лимфоцитов (CD19+IgD-CD27+), транзиторных клеток (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-), плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-) и плазмочитов (CD19+CD38+) в группе развернутого РА и увеличение уровня этих субпопуляций у пациентов, не получавших СБПВП, по сравнению со здоровыми лицами (контроль). Эти результаты могут быть объяснены миграцией В-клеток из кровотока интраартикулярно и дальнейшей продукцией АЦБ, что подтверждается более высокой частотой позитивности по АЦЦП и РФ у пациентов 2-й группы.

В то же время мы не обнаружили изменений «непереключенных» В-лимфоцитов (CD19+IgD+CD27+) при развернутом РА по сравнению с группой контроля, несмотря на снижение их числа у пациентов 1-й группы. Это противоречит данным F. Hu и соавт. [16], выявивших снижение уровня «непереключенных» В-лимфоцитов у больных РА, однако в это исследование были включены пациенты, получавшие ингибиторы ФНО α (иФНО α) и МТ. Как предположили авторы, наблюдаемые изменения связаны с нарушением функции данных лимфоцитов, что отмечено и в нашей работе. О нарушении функции В-клеток и изменении экспрессии поверхностных антигенов сообщают Y. Wang и соавт. [17], проанализировавшие большие

когорты больных РА (n=3494 и n=397). Были установлены значительное повышение уровней IgM и IgA в сыворотке крови при отсутствии роста субпопуляций В-лимфоцитов, а также увеличение количества данных антител у АЦЦП-позитивных пациентов, связанное с ростом числа дубль-негативных В-клеток (CD19+IgD-CD27-). В работе R.A. Moura и соавт. [18] у пациентов, не получавших терапии РА (n=13), и у больных, леченных МТ (n=20), также было обнаружено увеличение относительного числа дубль-негативных В-клеток.

По нашим данным, отмечается тенденция к увеличению числа дубль-негативных В-лимфоцитов у пациентов с высокой активностью и большей длительностью РА. Интересно, что рост этой субпопуляции может быть связан с истощением пула В-клеток памяти и воспалительным поражением В-лимфоцитов [16], что требует дальнейшего изучения. В исследовании S. Nakayamada и соавт. [19] обнаружено низкое относительное число В-клеток памяти в периферической крови больных РА по сравнению со здоровыми (контроль). Эти данные совпадают с результатами работы J. Lübberts и соавт. [20], в которой у 89 не получавших терапию РА пациентов было выявлено снижение уровня CD27+ В-клеток памяти по сравнению со здоровыми донорами, однако других изменений субпопуляций В-лимфоцитов не отмечено. В нашей работе у пациентов 1-й группы исходно уровень В-клеток памяти был аналогичен таковому у лиц контрольной группы, что может свидетельствовать о начальном гуморальном ответе на аутовоспаление, тогда как с увеличением длительности заболевания происходит down-регуляция В-клеток памяти. Интересно, что при этом у пациентов с развернутым РА серопозитивность по РФ и АЦЦП была статистически значимо выше. В исследовании M. Souto-Carneiro и соавт. [21] на фоне применения иФНО α уровень В-лимфоцитов памяти не изменялся, что, вероятно, связано с эффектом терапии и объясняет полученные нами данные. Кроме того, возможно сохранение определенного типа В-клеток, в частности В-клеток памяти, резистентных к терапии, что было неоднократно показано у пациентов, не отвечающих на лечение после применения блокаторов рецепторов CD20 [22–24]. Нельзя исключить, что в нашей работе резистентность к СБПВП во 2-й группе также может быть проявлением феномена ускользания эффективности терапии вследствие неполной деплеции отдельных групп CD27+ В-клеток, в частности В-клеток памяти [25].

В настоящем исследовании обнаружена статистически значимая линейная связь между увеличением ЧПС и числом плазмобластов ($r=0,51$), клеток памяти ($r=0,54$), отвечающих за продукцию антител, и числом «переключенных» В-лимфоцитов ($r=0,41$), что является ожидаемым итогом дифференцировки В-лимфоцитов. Иной клинико-лабораторной связи В- и Т-лимфоцитов при РА не выявлено.

Заключение. Изменение профиля В-лимфоцитов характерно для разных стадий РА. На ранней стадии отмечается увеличение числа транзиторных В-лимфоцитов, плазмобластов и плазмочитов, а в развернутой стадии – снижение уровня отдельных популяций В-лимфоцитов, таких как В-клетки памяти и «переключенные» В-лимфоциты. Возможно, что неэффективность СБПВП связана с изменением популяционного состава В-лимфоцитов, что требует дальнейшего изучения.

1. Насонов ЕЛ. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни. Научно-практическая ревматология. 2017;55(3):277-94.
- [Nasonov EL. Problems of immunopathology of rheumatoid arthritis: the evolution of the disease. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2017;55(3):277-94. (In Russ.)].
2. Harre U, Georgess D, Bang H, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*. 2012 May;122(5):1791-802. doi: 10.1172/JCI60975. Epub 2012 Apr 16.
3. Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, et al. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):721-9. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208093. Epub 2015 Nov 26.
4. Holers V, Banda N. Complement in the Initiation and Evolution of Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2018 May 28;9:1057. doi: 10.3389/fimmu.2018.01057. eCollection 2018.
5. Weyand C, Goronzy J. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Apr;987:1-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb06027.x.
6. Shi K, Hayashida K. Lymphoid Chemokine B Cell-Attracting Chemokine-1 (CXCL13) Is Expressed in Germinal Center of Ectopic Lymphoid Follicles Within the Synovium of Chronic Arthritis Patients. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):650-5. doi: 10.4049/jimmunol.166.1.650.
7. Mellado M, Martinez-Munoz L, Cascio G, et al. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2015 Jul 27;6:384. doi: 10.3389/fimmu.2015.00384. eCollection 2015.
8. Lino A, Dorner T, Bar-Or A, Fillatreau S. Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 2016 Jan;269(1):130-44. doi: 10.1111/imr.12374.
9. Wong P, Quinn J, Sims N, et al. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):158-68. doi: 10.1002/art.21537.
10. Abbas A, Janeway C Jr. Immunology: improving on nature in the twenty first century. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):129-38. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81689-x.
11. Насонов ЕЛ, Александрова ЕН, Авдеева АС, Рубцов ЮП. Т-регуляторные клетки при ревматических заболеваниях. Научно-практическая ревматология. 2014;52(4):430-7.
- [Nasonov EL, Aleksandrova EN, Avdeeva AS, Rubtsov YuP. T-regulatory cells in rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014;52(4):430-7. (In Russ.)].
12. Авдеева АС, Рубцов ЮП, Дыйканов ДТ, Насонов ЕЛ. Клинико-патогенетическое значение Foxp3+ регуляторных Т-клеток при ревматоидном артрите. Научно-практическая ревматология. 2016;54(4):442-55.
- [Avdeeva AS, Rubtsov YuP, Dyikanov DT, Nasonov EL. Clinical and pathogenetic significance of Foxp3+ regulatory T-cells in rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2016;54(4):442-55. (In Russ.)].
13. Alvarez-Quiroga C, Abud-Mendoza C, Doniz-Padilla L, et al. CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*. 2011 Aug;31(4):588-95. doi: 10.1007/s10875-011-9527-5. Epub 2011 Apr 13.
14. Pieper J, Herrath J, Raghavan S, et al. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. *BMC Immunol*. 2013 Aug 5;14:34. doi: 10.1186/1471-2172-14-34.
15. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, et al. B Cells in Rheumatoid Arthritis: From Pathogenic Players to Disease Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2014;2014:681678. doi: 10.1155/2014/681678. Epub 2014 Apr 29.
16. Hu F, Zhang W, Shi L, et al. Impaired CD27+IgD+ B Cells With Altered Gene Signature in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2018 Mar 23;9:626. doi: 10.3389/fimmu.2018.00626. eCollection 2018.
17. Wang Y, Lloyd K, Melas I, et al. Rheumatoid arthritis patients display B-cell dysregulation already in the naive repertoire consistent with defects in B-cell tolerance. *Sci Rep*. 2019 Dec 27;9(1):19995. doi: 10.1038/s41598-019-56279-0.
18. Moura R, Weinmann P, Pereira P, et al. Alterations on peripheral blood B-cell subpopulations in very early arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Jun;49(6):1082-92. doi: 10.1093/rheumatology/keq029. Epub 2010 Mar 7.
19. Nakayamada S, Kubo S, Yoshikawa M, et al. Differential effects of biological DMARDs on peripheral immune cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Jan 1;57(1):164-74. doi: 10.1093/rheumatology/kex012.
20. Lübberts J, van Beers-Tas M, Vosslander S, et al. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets during arthritis development in arthralgia patients. *Arthritis Res Ther*. 2016 Sep 14;18(1):205. doi: 10.1186/s13075-016-1102-2.
21. Souto-Carneiro M, Mahadevan V, Takada K, et al. Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R84. doi: 10.1186/ar2718. Epub 2009 Jun 5.
22. Reddy V, Klein C, Isenberg D, et al. Obinutuzumab induces superior B-cell cytotoxicity to rituximab in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patient samples. *Rheumatology (Oxford)*. 2017 Jul 1;56(7):1227-1237. doi: 10.1093/rheumatology/kex067.
23. Vital E, Rawstron A, Dass S, et al. Reduced-dose rituximab in rheumatoid arthritis: Efficacy depends on degree of B cell depletion. *Arthritis Rheum*. 2011 Mar;63(3):603-8. doi: 10.1002/art.30152.
24. Cambridge G, Leandro M, Teodorescu M, et al. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: Effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum*. 2006 Nov;54(11):3612-22. doi: 10.1002/art.22211.
25. Calero I, Nieto J, Sanz I. B Cell Therapies for Rheumatoid Arthritis: Beyond B cell Depletion. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010 May;36(2):325-43. doi: 10.1016/j.rdc.2010.02.003.

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted
29.01.2020/3.03.2021/7.03.2021

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315-90090.

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The research was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within scientific project № 19-315-90090.

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Мартынова А.В. <https://orcid.org/0000-0001-6840-4552>
Попкова Т.В. <https://orcid.org/0000-0001-5793-4689>
Алексанкин А.П. <https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>
Гриднева Г.И. <https://orcid.org/0000-0002-0928-3911>

Герасимова Е.В. <https://orcid.org/0000-0001-5815-561X>
Горбунова Ю.Н. <https://orcid.org/0000-0002-2024-6927>
Лила А.М. <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>